

ПЕРХЛОРИРОВАНИЕ – СКРИНИНГОВЫЙ МЕТОД ОБНАРУЖЕНИЯ ДИОКСИНОВ И РОДСТВЕННЫХ СОЕДИНЕНИЙ В ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЕ

Н.А.Клюев, Д.Б.Фешин, В.С.Сойфер

Институт проблем экологии и эволюции им.А.Н.Северцова РАН
117017, Москва, Ленинский пр., 33

Поступила в редакцию 2 февраля 2001 г.

На примере дибензо-п-диоксина (и его конгенеров) и дибензофурана проведено исследование реакции перхлорирования модифицированным реагентом ВМС с целью создания экспресс-методики обнаружения конгенеров упомянутой группы в реальных образцах. В найденных условиях проведено перхлорирование экстрактов образцов воды и воздуха. Показано, что в реальных матрицах можно обнаруживать диоксины в виде их октахлорпроизводных на уровне менее 1 нг в пробе при помощи метода ГЖХ с детектором электронного захвата.

Клюев Николай Алексеевич - заведующий лабораторией аналитической экотоксикологии Института проблем экологии и эволюции им.А.Н.Северцова Российской академии наук.

Область научных интересов: теоретическая органическая химия, молекулярная масс-спектрометрия, хромато-масс-спектрометрия, аналитические измерения в экологических исследованиях.

Автор более 450 публикаций в отечественных и международных изданиях и около 30 изобретений.

Фешин Денис Борисович – научный сотрудник лаборатории аналитической экотоксикологии Института проблем экологии и

эволюции им.А.Н.Северцова Российской академии наук.

Область научных интересов: органический синтез, экотоксикология, проблемы анализа стойких органических загрязнителей.

Автор 3 научных статей и 4 тезисов докладов.

Сойфер Владимир Соломонович – главный химик лаборатории аналитической экотоксикологии Института проблем экологии и эволюции им.А.Н.Северцова Российской академии наук.

Область научных интересов: выделение, концентрирование и очистка биологически-активных соединений.

Автор 35 научных статей и 20 тезисов докладов.

На современном уровне общественного сознания все явления в мире можно оценить с двух крайних позиций - их пользы для человечества в настоящем и будущем или их вреда. Общий подъем индустриализации, агрохимический прогресс в сельском хозяйстве суммарно приводят к общей "химизации" среды обитания и, как следствие, к повышению роли эколого-аналитического контроля (ЭАК) при решении проблем взаимодействия живого организма с окружающим миром. В этом случае происходит непроизвольное расширение номенклатуры как объектов исследования, так и числа антропогенных

ксенобиотиков. Среди них следует выделить загрязнители, воздействующие на среду обитания на чрезвычайно низком уровне (нижний предел обнаружения - 10^{-8} - 10^{-13} %) [1]. Именно к таким техногенным ксенобиотикам относятся диоксины, получившие название суперэкоотоксикантов (СЭТ) из-за ряда специфических признаков [2]. Под термином "диоксины" объединяется большая группа органических соединений, в которую входят сами полигалогенированные (полихлорированные) дибензо-п-диоксины (ПХДД), дибензофураны (ПХДФ) и планарные и полупланарные бифенилы (ПХБ).

Проблемы оценки содержания СЭТ в окружающей среде, прежде всего, связаны с достижением высокой чувствительности при аналитических измерениях. Эта причина стимулирует развитие самостоятельного направления в органической аналитической химии - анализа "ультра-следовых" количеств органических соединений, которое имеет свою методологию, качественные отличия в процедуре выделения и концентрирования СЭТ из различных природных матриц, свои особые приемы в очистке, во введении внутренних стандартов, а также свой достаточно узкий арсенал методов детектирования.

В настоящий момент лишь хромато-масс-спектрометрия (ХМС) низкого и высокого разрешения (и частично газожидкостная хроматография (ГЖХ) с электрозахватным детектором) способна достоверно обнаружить названные ксенобиотики [3]. Такое положение в анализе суперэкоотоксикантов не позволяет проводить широко-масштабное изучение загрязненных территорий даже на стадиях исследования экологического состояния района, не говоря уже о мониторинге, в задачу которого входит периодическая оценка существующего состояния природных объектов, прогноза развития их состояния в длительном интервале времени при существующей или изменяющейся технологической нагрузке. Аналитические измерения диоксинов в окружающей среде и биоте стоят достаточно дорого (от 800 до 2000\$ в зависимости от статуса зарубежной лаборатории и вида анализируемой природной матрицы), что ограничивает проведение широкомасштабных исследований и мониторинга. Возникает вопрос, как упростить, ускорить и удешевить процедуру анализа диоксинов? Одним из вариантов является **снижение количества анализируемых проб** без ухудшения информационных показателей о степени загрязненности конкретного района (территориальный уровень). Отобранная проба (природная матрица) в этом случае должна быть представительной (или интегральной). Такая матрица должна быть липофильной, т.к. именно в таких пробах накапливаются диоксины. Это известное явление, называемое биоаккумуляцией, специфичное для СЭТ, автоматически снижает весовое количество и объем анализируемой пробы и, как следствие, приводит к уменьшению количества расходных материалов при пробоподготовке. Значение ПДК для таких матриц (молоко, мясо, масло и т.д.) всегда ниже, чем для гидрофильных проб (вода, воздух, снег и т.д.). Например, печень рыбы играет роль интегральной матрицы и позволяет

достоверно судить о наличии диоксинов в воде и донных отложениях. По биологическим признакам для той же рыбы можно определить её возраст, акваторию существования и тем самым сделать "привязку" к конкретной местности. Аналогичным образом в качестве интегральной матрицы, показывающей степень загрязненности почвы, воды и растений в районе отбора пробы, можно рассматривать и коровье молоко.

Уменьшить количество проб для проведения аналитических измерений диоксинов можно путем проведения **предварительного скрининга**, который должен произвести сортировку проб, определив в них наличие или отсутствие диоксинов.

В этом случае упрощение анализа может быть связано с использованием методов биоиндикации и биотестирования [4], биохимического определения (иммунохимический анализ) [5] и химико-аналитических методов с использованием упрощенных методик, например возникновение устойчивых комплексов "диоксинов" с металлами [6] с последующим определением металла в составе комплекса различными методами (атомно-абсорбционная спектроскопия, атомно-эмиссионная спектроскопия с индуктивно-связанной плазмой).

Вряд ли можно существенно упростить анализ за счет самих аналитических измерений (методы ГЖХ и ХМС), поскольку они детально изучены и апробированы для указанных целей (методы EPA US № 613, 1613, 8280, 8290 и др., а также отечественные методики, внесенные в Госреестр методик КХА: ПНДФ 14.1:2.4.124-97; 13.3.9-97; 13.3.10-97; 16.1.7-97).

Официально признанных скрининговых методов детектирования два: иммунохимический (EPA Dioxin RIS-TEST - ENSYS INC. n70700(US) и реакция перхлорирования (EPA n 508.A (1989)). Последний метод разработан для анализа проб воды и воздуха на содержание ПХБ и связан с переводом всех изомеров в декахлорбифенил (ДХБ). В обоих случаях значительно упрощается и удешевляется способ детектирования. Попытки использовать этот метод для скрининга диоксинов предпринимались неоднократно (фирма "Экрот" С-Петербург, лаб. аналитической экотоксикологии ИПЭЭ им.А.Н.Северцова РАН, объект "Шиханы"), но до сих пор в РФ не существует аттестованных методик по перхлорированию [7 - 10]. Предлагаемые методики EPA-US трудоемки и по-прежнему дороги, к тому же скрининговый отбор проб решает в большей степени только вопрос

присутствия диоксинов, и повторный анализ по предложенной схеме все равно является необходимым дополнением. Поэтому целесообразно использовать двухстадийную схему анализа, когда на первой стадии применяется более дешевая и производительная скрининговая методика, позволяющая отсеивать пробы с низким содержанием диоксинов и отбирать пробы, в которых подозреваются высокие концентрации диоксиноподобных соединений для последующего анализа методами ХМС.

Существующие методы скрининг-контроля, такие как биотестирование, в том числе весьма чувствительный иммуноферментный метод, недостаточно селективны и специфичны. По времени и стоимости анализа ПХДД, ПХДФ и ПХБ они сравнимы с методом ХМС высокого разрешения. Метод перхлорирования, когда каждый класс детектируемых соединений - ПХДД, ПХДФ, ПХБ и др. – регистрируется в виде одного сигнала, фактически неотработан.

Такая методика неспецифична, т.е. она не позволяет отдельно детектировать наиболее токсичные конгенеры диоксинов и родственных соединений, но она вполне пригодна для целей скрининга - отсеивания проб с малым содержанием диоксинов. Пробы, обнаружившие на стадии скрининга относительно высокое содержание диоксинов и родственных соединений, могут далее анализироваться традиционными методами.

Выбор перхлорирующего агента

Поставленная задача подразумевает использование только прямого галогенирования незамещенного или малогалогенированного предшественника того или иного СЭТ, что моделировало бы нахождение ПХДД, ПХДФ и ПХБ в природных матрицах. Проблема состоит в том, что известные методы прямого галогенирования не дают высоких выходов полностью хлорированных производных диоксина и приводят к образованию трудноразделимой смеси различных не полностью хлорированных конгенов [7, 8]. Очевидно, что одной из причин получения такой смеси является сложность замещения последнего атома водорода в ароматическом цикле, в связи со стерическими факторами, связанными с размерами атома хлора [11]. В этом случае преодоление стерических препятствий происходит через деформацию молекулы с потерей планарной структуры и образованием энергетически более выгодной креслообразной формы [12, 13]. В структуре октахлордibenzo-*p*-диоксина (ОХДД) наблюдаются отклонения от планарности, так пары ато-

мов хлора в положениях 1,4 и 2,3 оказываются по разные стороны плоскости углеродного скелета молекулы [14].

Однако нам представляется возможным получить перхлорированные соединения, т.к. в реальном процессе диоксины в матрице (почва, аэрозоль и т.д.) находятся на уровне нг/г - пг/г, а хлорирующий агент будет присутствовать в колоссальном избытке. Несмотря на большое количество литературы, посвященной методам введения атома галогена в ароматическое кольцо, избыточно галогенированные продукты не часто являются целевыми соединениями органического синтеза. Нами упоминалось об использовании SbCl_5 в присутствии железного катализатора в качестве перхлорирующего агента, используемого для скрининга ПХБ (методика EPA 508a) и смеси $\text{AlCl}_3:\text{S}_2\text{Cl}_2$ и SO_2Cl_2 в соотношении 1:2:1000 [9] для перхлорирования диоксинов. Однако при применении SbCl_5 необходимо соблюдать меры взрывобезопасности как на стадии проведения реакции (термостатирование при 270°С), так и на стадии разложения реакционной смеси. Использование методики [9] также связано с рядом неудобств, в частности, из-за применения криогенной техники (количественное и качественное определение продукта перхлорирования проводится при температуре жидкого азота).

Нами обнаружено, что только один реагент ВМС на основе хлористого сульфурита, AlCl_3 и S_2Cl_2 позволяет целевым образом получать пергалогенированные ароматические соединения [15].

В начале 20-х годов XX века Osvald Silberrad, проводя исследования по поиску хлорирующих систем на основе хлористого сульфурита (с добавками I_2 , S , S_2Cl_2 , AlCl_3 , FeCl_3 и др.), впервые описал чрезвычайно мощный реагент, образующийся при смешивании AlCl_3 , SO_2Cl_2 и S_2Cl_2 , позволяющий селективно хлорировать ароматическое ядро [16, 17]. В этом случае, например, 70 % выход гексахлорбензола достигался реакцией 0,8 моля (314 г) хлорирующего агента и 1 моля $\text{C}_6\text{H}_2\text{Cl}_4$. Сорока годами позже метод был усовершенствован [15], а сам реагент получил в название аббревиатуру ВМС, по заглавным буквам фамилий людей, исследовавших его, - Ballester, Molinet, Castaner [18, 19]. Этот реагент представляет собой смесь $\text{AlCl}_3:\text{S}_2\text{Cl}_2$ в соотношении 1:2 в хлористом сульфурите в качестве растворителя. К сожалению, строение и настоящий состав комплексного катализатора ВМС неизвестен, так как исходные компоненты (AlCl_3 и S_2Cl_2) претерпевают глубокие изменения во время процесса приготовления [15].

В результате многочисленных исследований были разработаны и другие способы получения полихлорированных соединений [20], которые были использованы для синтеза 55 новых (до 1966 года) высокохлорированных соединений, включающих 4 перхлоркетона, 4 перхлоркислоты, 4 перхлорэфира, 31 хлороуглерод. Среди этих веществ - производные толуола, ксилола и *n*-ксилола [19], стирола, дифенилэтана, бифенила, антрацена, фенантрена, флюорена, бензола и бифениловых полимерных хлороуглеродов (см. обзоры [15, 21, 22]). Взаимодействием ВМС с трифенилметаном был получен (и исследованы его свойства) перхлортрифенилметилловый радикал [15, 23, 24], который является самым стабильным из всех известных на сегодняшний день.

Анализ литературных данных показывает, что существует три метода введения хлора в ароматическое (гетероароматическое) ядро:

1. Взаимодействие с хлором в присутствии кислот Льюиса (AlCl_3 , FeCl_3 , SbCl_3 , ZrCl_4 и т.д.) или протонных кислот, таких как ледяная уксусная или трифторуксусная. Данная реакция протекает по электрофильному механизму. Установлено, что степень хлорирования возрастает при использовании в качестве катализатора AlCl_3 и при увеличении избытка Cl_2 [25].

2. Использование хлористого сульфурита в качестве хлорирующего агента при повышенных температурах (70-90°С). Эта реакция протекает по электрофильному механизму [18, 26].

3. Применение реагента ВМС - смеси SO_2Cl_2 , AlCl_3 и S_2Cl_2 (структура комплекса неизвестна) [15].

Во всех названных случаях перхлорирование субстрата достигало не более 90%. Из трех способов хлорирования, на наш взгляд, перспективным является использование реагента ВМС, дающего наиболее высокие выходы перхлорированных продуктов.

Экспериментальная часть

Приборы и материалы

В работе использовали газожидкостной хроматограф Hewlett-Packard модели А-5890, управляемый микропроцессором на базе компьютера HP серия 300, импульсный ЭЗД (^{63}Ni , ионизация β -частицами), газ - азот, объемная скорость подачи газа на детектор 25 мл/мин.

Режим хроматографирования №1

Капиллярная колонка длиной 25 м, диаметр - 0,32 мм, нанесенная фаза - HP-5, толщина пленки 0,52 мкм, газ-носитель - азот, объемная скорость подачи газа - 2 мл/мин. Температурный режим колонки: 120°С - 1 минута (изотерма), на-

гревание со скоростью 20°С/мин до 220°С, нагревание со скоростью 5°С/мин до 280°С, задержка при 280°С в изотерме 18 мин. Температура инжектора 240°С, температура детектора 280°С.

Режим хроматографирования №2

Капиллярная колонка длиной 5 м, диаметр - 0,32 мм, нанесенная фаза - HP-5, толщина пленки 0,52 мкм, газ-носитель - азот, объемная скорость подачи газа - 2 мл/мин. Температурный режим колонки: 120°С - 1 минута (изотерма), нагревание со скоростью 20°С/мин до 220°С, нагревание со скоростью 5°С/мин до 280°С, задержка при 280°С в изотерме 1 мин. Температура инжектора 240°С, температура детектора 280°С.

Хромато-масс-спектры регистрировались на приборе марки HP-5972-N (хроматограф HP-6840) с масс-спектрометрическим детектором типа "ионная ловушка" (Finnigan-MAT-ITD-700). В хроматографе стояла капиллярная колонка длиной 30 м, диаметром 0,25 мм, нанесенная фаза DB-5-MS, толщина пленки 0,25 мкм, газ-носитель - гелий, объемная скорость подачи газа - 1 мл/мин с постоянным регулированием, не зависящим от температуры. Ионизация электронным ударом 70 эВ, скорость сканирования - 1 масс-спектр в секунду, диапазон масс - 650 а.е.м., разрешающая способность - единичная. Условия хроматографического анализа реакционной смеси: 120°С - 1 минута (изотерма), нагревание со скоростью 20°С/мин до 220°С, нагревание со скоростью 5°С/мин до 280°С, задержка при 280°С в изотерме 10 мин, температура инжектора 240°С, температура соединительной линии (интерфейс) 240°С. Инжектирование проводилось в режиме "splitless" с задержкой продувки 0,5 мин.

Органические фракции после экстракций упаривали в пробирках с коническим дном на нагревательном столике Multi-Blok Heater Lab-Line с продувкой воздухом, а также в колбах на ротационном испарителе.

В работе использовались обычные имеющиеся в продаже реактивы марки х.ч. и ч.д.а.

Очистка реактивов

Хлористый сульфурит очищали перегонкой ($T_{\text{кип}} = 68 - 70^\circ\text{C}$). Монохлористую серу очищали перегонкой ($T_{\text{кип}} = 138^\circ\text{C}$). Безводный хлорид алюминия очищали возгонкой и хранили в запаянных ампулах.

Приготовление растворов

Приготовление исходного раствора дибензо-*n*-диоксина (ДД)

В мерную колбу емкостью 50 мл добавляли 2,63 мг дибензо-*n*-диоксина и растворяли в ука-

занном объеме CH_2Cl_2 марки ос. ч., затем 0,47 мл приготовленного раствора помещали в другую мерную колбу объемом 50 мл и разбавляли CH_2Cl_2 до метки. Получили раствор с концентрацией 500 нг/мл.

Приготовление калибровочных растворов декахлорбифенила (ДХБ)

Для получения раствора декахлорбифенила с концентрацией 1 мкг/мл 80 мкл стандартного раствора ДХБ в гексане концентрацией 50 мкг/мл переносили микрошприцем в отдельный флакон, отгоняли растворитель в вакууме и растворяли остаток в 4 мл CCl_4 или толуола. Далее последовательным разбавлением получали растворы ДХБ в толуоле с концентрациями 500 нг/мл, 100 нг/мл, 10 нг/мл, 1 нг/мл.

Приготовление калибровочных растворов октахлордibenзо-*p*-диоксина (ОХДД) и октахлордibenзофурана (ОХДФ)

Для получения раствора октахлордibenзо-*p*-диоксина с концентрацией 1 мкг/мл 80 мкл стандартного раствора ОХДД в ацетоне концентрацией 50 мкг/мл переносили микрошприцем в отдельный флакон, отгоняли растворитель в вакууме и растворяли остаток в 4 мл толуола. Далее последовательным разбавлением были получены растворы ОХДД в толуоле с концентрациями 500 нг/мл, 100 нг/мл, 10 нг/мл, 1 нг/мл.

Аналогичным образом готовили исходный и калибровочные растворы ОХДФ.

Определение линейной зависимости для ОХДД, ОХДФ и ДХБ в области концентраций 1 нг/мл - 1 мкг/мл в методе ГЖХ с ЭЗД

Для построения калибровочного графика калибровочные растворы ОХДД, ОХДФ и ДХБ и хроматографировали в режиме № 1. Объем вводимой в хроматограф аликвоты - 2 мкл. Результаты анализа представлены на рис. 1.

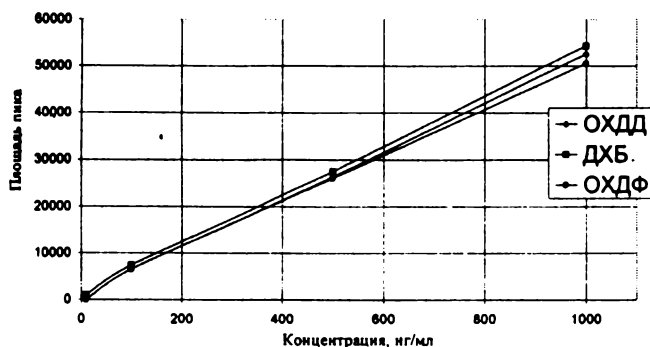


Рис. 1. График области линейной зависимости для ОХДД, ОХДФ и ДХБ

Определение фактора отклика для ОХДД

В отдельном флаконе смешивали 100 мкл раствора ДХБ и 100 мкл раствора ОХДД с концентрацией 1 мкг/мл. Получали раствор, содержащий ОХДД и ДХБ в соотношении 1:1. Для определения фактора отклика для ОХДД хроматографировали аликвоту полученного раствора объемом 2 мкл. Фактор отклика устанавливали по формуле:

$$\frac{S_D}{S_O} = K \cdot \frac{m_D}{m_O}$$

где S_O и S_D - площади пиков ОХДД и ДХБ, определяемые компьютерным интегрированием; K - фактор отклика; m_O и m_D - массы ОХДД и ДХБ. Величина K составила 0.35.

Выход ОХДД в реакциях определяли по следующей формуле:

$$\text{Выход (\%)} = \frac{S_{\text{ОХДД}}^{\text{практ}}}{S_{\text{ДХБ}}^{\text{практ}}} \cdot \frac{m_{\text{ДХБ}}}{m_{\text{т}}^{\text{ОХДД}}} \cdot K \cdot 100$$

Здесь $S_{\text{ОХДД}}^{\text{практ}}$ и $S_{\text{ДХБ}}^{\text{практ}}$ - определенные из хроматограмм машинным интегрированием площади пиков продукта и стандарта соответственно; $m_{\text{ДХБ}}$ - известное количество добавленного стандарта; K - фактор отклика; $m_{\text{т}}^{\text{ОХДД}}$ - теоретически рассчитанная по известному количеству исходного вещества масса продукта, соответствующая 100 % выходу.

Препаративное перхлорирование диоксинов реагентом ВМС (методика №1)

К кипящему раствору 25-30 мг AlCl_3 в 7-8 мл SO_2Cl_2 , помещенному в колбу, снабженную обратным холодильником и подогреваемую на масляной бане, из капельной воронки медленно (~20 мин) добавляли раствор субстрата в 2-3 мл SO_2Cl_2 и 30 мкл S_2Cl_2 . Затем убирали холодильник и упаривали раствор примерно до половины, после чего продолжали кипятить с обратным холодильником в течение 4 - 5 часов, время от времени добавляя свежий SO_2Cl_2 для поддержания постоянного объема.

По истечении необходимого времени упаривали SO_2Cl_2 , добавляли 15% раствор поташа до прекращения выделения газов. Содержимое колбы переносили в плоскодонную колбу (сама колба многократно промывалась с озвучиванием в ультразвуковой бане), добавляли органический растворитель (бензол или хлористый метилен) и воду, а затем "озвучивали" в ультразвуковой бане 10 минут. Органический слой отделяли от водного на делительной воронке и сушили над безводным сульфатом натрия. Экстракт пропускали через колонку, заполненную послойно (снизу вверх) 2 г Na_2SO_4 , 1 г K_2SiO_3 , 2 г Na_2SO_4 , 3 г $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{SiO}_2$ 40/60.

2 г Na_2SO_4 , 3 г $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{SiO}_2$, 2 г Na_2SO_4 , 3 г $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{SiO}_2$, 2 г Na_2SO_4 , затем промывали колонку хлористым метиленом в объеме, равном трем объемам колонки. Органический слой пропускали через колонку с высокоактивным силикагелем (колонка промывалась тройным объемом растворителя) и упаривали. Часть сухого остатка растворяли в толуоле и исследовали на хромато-масс-спектрометре:

а) 100 мг дибензо-*n*-диоксина хлорировали реагентом ВМС в течение 5 часов. Было получено 105 мг смеси ПХДД. Содержание ОХДД составило 88,4 %. Содержание производных дибензо-*n*-диоксина с меньшей степенью хлорирования (от 4 до 7) составило 11,6 %;

б) 100 мг дибензо-*n*-диоксина хлорировали реагентом ВМС в течение 4 часов. Получено 232 мг ОХДД (выход 93 %). Чистота полученного ОХДД составила более 99,5 %, $T_{\text{пл.}} = 332^\circ\text{C}$. Данные ХМС-анализа: время удерживания - 29,50 мин, масс-спектр - $M^+ M/Z=456$, $(M+2)^+ M/Z=458$.

Препаративное перхлорирование дибензофурана

Перхлорирование дибензофурана проводили по методике №1. 24,8 мг дибензофурана хлорировали реагентом ВМС в течение 3,5 часов. Получено 62 мг октахлордибензофурана (ОХДФ) (выход 94 %). Чистота полученного ОХДФ составила более 99,9 %, $T_{\text{пл.}} = 260^\circ\text{C}$. Данные ХМС-анализа: время удерживания - 24,38 мин, масс-спектр - $M^+ M/Z=440$, $(M+2)^+ M/Z=442$.

Приготовление реактива ВМС для экспериментов в ампулах

В мерную колбу с длинным узким горлом объемом 25 мл с кипящим SO_2Cl_2 (около 2 мл) добавляли ~10 мг AlCl_3 , а затем прикапывали ~10 мкл S_2Cl_2 . Выпавшие из раствора игловидные кристаллы растворяли добавлением свежего SO_2Cl_2 (3-5 мл). Полученный горячий раствор пипеткой переносили в ампулы с субстратом.

Эксперименты в ампулах (методика №2)

Вампулу объемом около 1 мл помещали 100 мкл раствора ДД в хлористом метиле концентрации 500 нг/мл (50 нг вещества), отгоняли растворитель в вакууме, затем продували аргоном, после чего добавляли реагент ВМС объемом около 200 мкл. Ампулы запаивали и термостатировали.

После истечения времени реакции ампулы охлаждали, вскрывали, добавляли в каждую ампулу 50 или 100 мкл раствора внутреннего стандарта (раствор декахлорбифенила с концентра-

цией 1 мкг/мл) в CCl_4 (50 или 100 нг), затем растворители отгоняли в вакууме, добавляли около 200 мкл 15 % водного раствора поташа, дважды экстрагировали бензолом по ~200 мкл. Органическую фракцию отбирали пипеткой, помещали в пробирку с коническим дном и упаривали досуха на нагревательном столике с продувкой воздухом, добавляли от 10 до 30 мкл толуола и хроматографировали в режиме №2.

Идентификацию и количественное определение продукта ОХДД проводили по пику со временем удерживания 13,1 мин.

Результаты представлены в таблице.

Выходы ОХДД при перхлорировании дибензо-*n*-диоксина реагентом ВМС в ампулах

$T, ^\circ\text{C}$	Время, час	Выход, %
70	2	0
70	4	0
60	20	11
110	22	4
150	24	8

Проведение реакции перхлорирования с реагентом ВМС in situ (методика №3)

Надфиль (N.0 или N.1) обезжиривали органическим растворителем, сушили. Этим надфилем опиливали кусок дюралюминия (марки Д16 или Д18) для получения опилок. Опилки хранили в закрытом стеклянном сосуде. Затем раствор образца в 0,2-0,3 см³ органического растворителя (хлористый метилен, толуол, ацетон) помещали во флакон с завинчивающейся крышкой с тефлонированной прокладкой вместимостью 1,5 см³. Раствор упаривали при температуре около 40°C в слабом токе азота. Затем во флакон помещали 30 мг дюралюминиевых опилок, 3-4 мг порошкообразной серы и 300 мкл хлористого сульфурила SO_2Cl_2 . Флакон закрывали и помещали в термостат с температурой 70°C. Термостатировали 4 часа при 70°C, затем вынимали и охлаждали до комнатной температуры. Флакон с реакционной смесью открывали и переносили раствор во флакон с коническим дном с помощью пипетки с оттянутым носиком (пипетка Мора) так, чтобы весь катализатор остался в первом флаконе. Флакон с SO_2Cl_2 помещали в вакуумный эксикатор, на дно которого помещали щелочь (NaOH или KOH); эксикатор присоединяли к водоструйному насосу и откачивали до полного испарения SO_2Cl_2 , флакон вынимали, прибавляли 200-300 мкл толуола, обмывая стенки сосуда; раствор упаривали до 5-10 мкл в слабом токе азота.

Перхлорирование незамещенного дибензо-*p*-диоксина

Перхлорирование проводили в соответствии с методикой №3. Для реакции брали 10 нг дибензо-

p-диоксина. Продукт реакции растворяли в 20 мкл толуола и хроматографировали в режиме №1. Идентификацию ОХДД осуществляли по пику с временем выхода 28.1 мин. (см.рис.2).

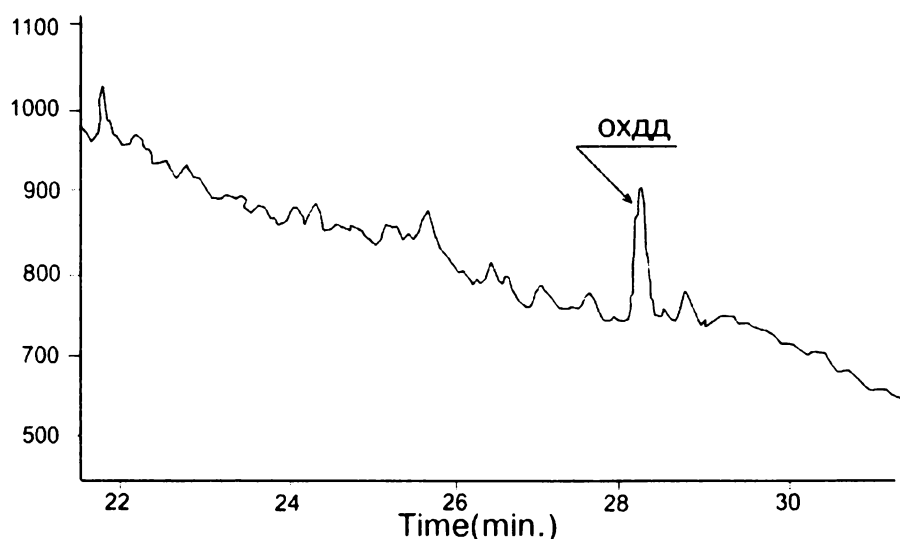


Рис.2. Фрагмент хроматограммы продуктов реакции перхлорирования дибензо-*p*-диоксина реагентом ВМС по методике №3. По оси абсцисс отложено время выхода, по оси ординат - интенсивность сигнала с детектора электронного захвата

Перхлорирование незамещенного дибензофурана

Перхлорирование проводили в соответствии с методикой №3 с 10 нг дибензофурана. Продукт

реакции растворяли в 20 мкл толуола и хроматографировали в режиме №1. Идентификацию ОХДФ осуществляли по пику с временем выхода 26.1 мин. (см.рис.3).

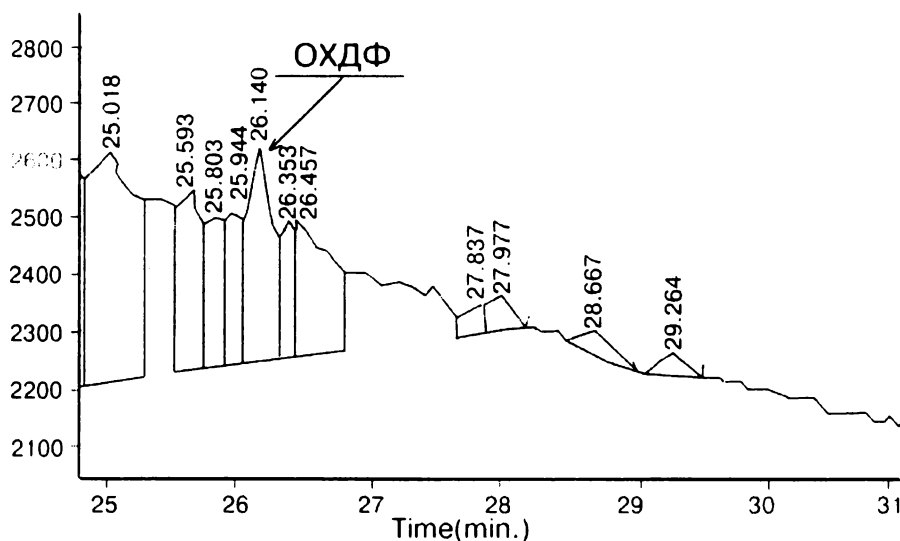


Рис.3. Фрагмент хроматограммы продуктов реакции перхлорирования дибензофурана реагентом ВМС по методике №3. По оси абсцисс отложено время выхода, по оси ординат - интенсивность сигнала с детектора электронного захвата

Перхлорирование 1,2,3,4-тетрахлордibenzo-*p*-диоксина

Перхлорирование 5 нг 1,2,3,4-тетрахлордibenzo-*p*-диоксина проводили в соответствии с методикой №3. Продукт реакции растворяли в 25 мкл толуола и хроматографировали в режиме №1. Идентификацию ОХДД осуществляли по пику с

временем выхода 28.1 мин.

Перхлорирование экстрактов воды (три независимых образца)

В соответствии с методикой №3 проводили перхлорирование экстракта, полученного из реальной пробы воды по стандартной сертифика-

рованной методике. Анализ проб, проведенный перед перхлорированием методом МСВР на приборе "Вариан Н-SQ-30", показал содержание 17 конгенов ПХДД и ПХДФ в количестве 0.5 нг в пробе. Продукт реакции растворяли в 25 мкл толуола и хроматографировали в режиме №2. Результат представлен на рис.4. Стрелками отмечены пики, соответствующие ОХДД/ОХДФ.

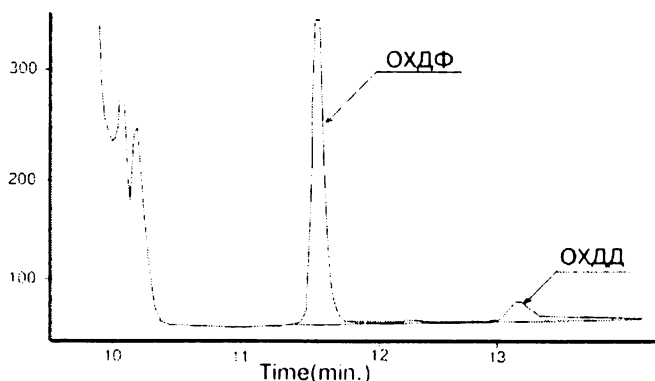


Рис.4. Фрагмент хроматограммы продуктов реакции перхлорирования экстракта пробы воды реагентом ВМС по методике №3: по оси абсцисс отложено время выхода, по оси ординат - интенсивность сигнала с детектора электронного захвата

Перхлорирование экстрактов воздуха (три независимых пробы)

Перхлорированию в соответствии с методикой №3 подвергали экстракты газовых проб, полученных при горении пластмасс. Пылевая фракция, содержащая ОХДД и ОХДФ, была отделена перед экстракцией. Остальная часть фильтра обрабатывалась по стандартной сертифицированной методике (ПНДФ 13.3.10-97). Анализ методом МСВР показал содержание конгенов ПХДД и ПХДФ (без ОХДД и ОХДФ) в количестве 0.5 нг на пробу. Продукт реакции растворяли в 25 мкл толуола и хроматографировали в режиме №2. Результат представлен на рис.5. Стрелками отмечены пики, соответствующие ОХДД/ОХДФ.

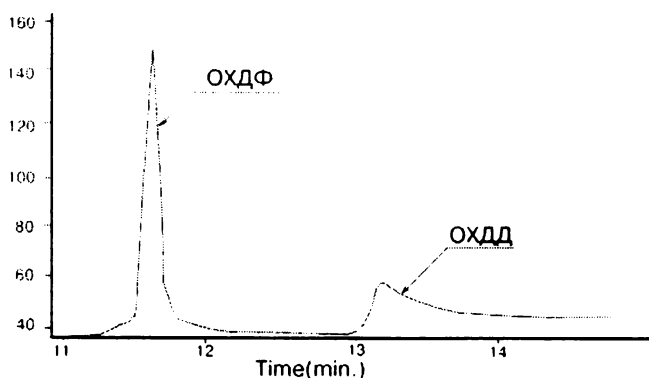


Рис.5. Фрагмент хроматограммы продуктов реакции перхлорирования экстрактов газовых проб реагентом ВМС по методике №3: по оси абсцисс отложено время выхода, по оси ординат - интенсивность сигнала с детектора электронного захвата

Обсуждение результатов

Сама по себе идея создания скрининговой методики подразумевает решение нескольких основных задач, направленных на сокращение времени между началом анализа и получением результата для конкретного образца. При проведении типичного анализа какого бы то ни было образца (вода, воздух, почва, биота и т.д.) необходимо пройти через стадии пробоотбора и пробоподготовки, прежде чем направить образец на анализ. При этом, в зависимости от типа образца, применяются различные методы пробоподготовки, различающиеся по трудоёмкости манипуляций. Сам же анализ подразумевает точное определение конгенерного состава образца, что достигается посредством использования ХМС с длинными колонками (30-40 м) для наиболее полного разделения компонентов. При этом само время анализа одного единственного образца может достигать часа. Прибавьте к этому время на пробоподготовку и получится, что затраты времени на получение результата могут составлять несколько суток.

Предлагаемая нами идея скрининговой методики определения СЭТ диоксиновой группы предполагает, во-первых, минимализацию пробоподготовки (или полный отказ от неё), во-вторых, химическое превращение ПХДД, ПХДФ и ПХБ в перхлорированные производные и их определение, в-третьих, минимализацию обработки реакционной смеси образец/хлорирующий агент перед проведением анализа (или полный отказ от неё). В итоге можно упростить методику анализа ПХДД, ПХДФ и ПХБ за счет проведения реакции перхлорирования непосредственно на природной матрице. Проводя стадию экстракции суперэкоотоксикантов из анализируемой пробы (почва, вода, воздух, биота, пища и т.д.), возможно затем провести перхлорирование органической части до образования трех детектируемых компонентов - ОХДД, ОХДФ и ДХБ. Детектирование предлагается проводить методом ГЖХ с электронозахватным детектором, измеряя названные выше компоненты смеси. В этом случае чувствительность метода полностью удовлетворяет требуемую степень обнаружения, а фон от мешающих компонентов других ксенобиотиков как бы исчезает из-за очень больших времен выхода с колонки определяемых ОХДД, ОХДФ и ДХБ. Поскольку зачастую содержание анализируемых соединений в образцах не превышает максимум десятков нанограмм, то использование значительного избытка хлорирующего агента способно, на наш взгляд, перевести их в перхлорпроиз-

водные, несмотря на присутствие большого количества балластных веществ.

Получаемый результат будет являться некой суммой вкладов от каждого конгенера. Точно так же, как при проведении типичного анализа результат представляется суммарно в единицах токсичности относительно 2,3,7,8-ТХДД. Проведённое в работе [27] рассмотрение статистики анализа проб различных образцов показывает, что качественный состав конгенеров и их процентное соотношение в анализируемых образцах фактически постоянно. Поэтому мы полагаем, что возможно проведение достаточно надежной корреляции между результатом, полученным при проведении реакции перхлорирования, и реальным составом не измененного химически образца.

При обосновании выбора хлорирующего агента мы выделили в качестве наиболее перспективного реагент ВМС. В настоящее время известен только один случай применения реакции перхлорирования реагентом ВМС для гетероарильных соединений с простой эфирной связью, к каковым относятся ксенобиотики ПХДД и ПХДФ [9]. Однако нет никаких количественных данных о протекании этого процесса.

Нами использован реагент ВМС для хлорирования незамещенного дибензо-*p*-диоксина и дибензофурана, которые были выбраны в качестве модельных соединений. Хлорирование проводили с варьированием температуры (70 – 90°С) и соотношения AlCl_3 и S_2Cl_2 (от 1:2 до 2:1) (см. экспериментальную часть).

Проведенный ХМС-анализ выделенной смеси с использованием образцов известного состава показал, что основное соединение представляет собой октахлордибензо-*p*-диоксин (ОХДД): время удерживания 29.219 мин, молекулярный ион - M^+ ($\text{M}/\text{Z}=456$), соотношение интенсивностей пиков $(\text{M}+2)^+$ и M^+ - 2.53 (расчетное значение 2.6). Выход ОХДД составлял от 42 до 93 %, а чистота - от 92 до >99.5%. При анализе всегда наблюдались в незначительных количествах промежуточные продукты с меньшей степенью хлорирования.

Было найдено, что процесс протекает с большими выходами при температуре кипения хлористого сульфурита (68 – 70°С) и при соотношениях AlCl_3 и S_2Cl_2 1:1 и 2:1. При проведении хлорирования при больших температурах и при соотношении AlCl_3 и S_2Cl_2 1:2 выход снижается.

Низкий выход (42 %) мы связали с гидролизом AlCl_3 (наблюдалось выпадение осадка), потому что перед внесением в реакционную смесь он слишком долго (~ 10 мин) контактировал с возду-

хом после вскрытия запаянной ампулы. Во всех последующих экспериментах AlCl_3 вносили в реакционную смесь сразу же после вскрытия ампулы. Проведенный с учетом влияния всех вышеперечисленных факторов эксперимент привел к получению ОХДД, выход и чистота которого составили 93 и 99.6 % соответственно.

Этот опыт перхлорирования был использован и для других гетероароматических трициклических соединений. Так, взаимодействие дибензофурана с реагентом ВМС при 70°С приводит к образованию также практически одного соединения - октахлордибензофурана (ОХДФ), который был выделен с выходом 94 %. ХМС-анализ реакционной смеси не показал наличия продуктов промежуточного хлорирования (моно-, ди-, три-, тетра- и др.), образуется только ОХДФ: время удерживания 24.38 мин, молекулярный ион - M^+ ($\text{M}/\text{Z}=440$), соотношение интенсивностей пиков $(\text{M}+2)^+$ и M^+ равно - 2.5 (расчетное значение 2.6).

Таким образом, исследование реакции перхлорирования гетероароматических соединений реагентом ВМС показало принципиальную возможность использования данной реакции для перхлорирования производных дибензо-*p*-диоксина и дибензофурана, среди которых находятся наиболее опасные ксенобиотики.

На основе этой реакции возможна разработка методики качественного скрининга ксенобиотиков диоксинового ряда, однако необходимость обнаружения ультраследовых количеств (в лучшем случае нанограммы и десятки нанограмм) требовала проведения специального исследования протекания этой реакции на ультраследовом уровне. Поскольку в природных матрицах чаще всего приходится анализировать полихлорированные диоксины, дальнейшие эксперименты проводились с дибензо-*p*-диоксином.

Эксперименты проводили в запаянных ампулах для предохранения от воздействия влаги воздуха и для удобства работы с ультраследовыми количествами СЭТ. Реагент ВМС готовился отдельно в колбе с длинным узким горлом и вносился в ампулу в свежем виде перед запаиванием. Аналитический контроль осуществляли методом ГЖХ с электрозахватным детектором по методу внутреннего стандарта. В качестве внутреннего стандарта был выбран декахлорбифенил.

Проведение хлорирования при 60-70°С показало, что реакция с ультрамалыми количествами субстрата отличается от препаративных и протекает с пониженным выходом – около 10 %. Варьирование температуры до 150°С также не

привело к существенному увеличению выхода перхлорированного диоксида. В ампулах наблюдалось выпадение хлопьевидного осадка, свидетельствующего о гидролизе катализатора еще в процессе термостатирования, появление которого не зависело ни от тщательности приготовления хлорирующего агента, ни от сокращения времени между внесением реактива в ампулу и ее запаиванием, ни от дополнительного осушивания ампул в сушильном шкафу.

Очевидно, что при проведении экспериментов с ультраследовыми количествами диоксида высокая чувствительность реагента ВМС к влаге воздуха приводит к его гибели, и не спасает даже громадный избыток (более чем десятикратный) реагента по отношению к дибензо-*p*-диоксину.

В этой связи было предложено проводить реакцию с образованием реагента ВМС *in situ* в процессе самой реакции. С этой целью в реакционную смесь, содержащую ПХДД или ПХДФ вводят алюминиевый порошок. При нагревании с SO_2Cl_2 на поверхности порошка образуется AlCl_3 и сера или хлорид серы.

Серия опытов, проведенная в этих условиях, дала невысокие выходы (контроль осуществлялся методом ГЖХ с ЭЗД), однако результаты были чрезвычайно стабильны (выходы ОХДД и ОХДФ составляли порядка 40 %).

Лучшие результаты по перхлорированию смесей, содержащих диоксины, были получены при замене чистого алюминия на дюралюминий (вероятнее всего, из-за меньшей коррозионной стойкости и больших скоростей реакции).

Реакцию перхлорирования с указанной выше смесью $[\text{SO}_2\text{Cl}_2 + \text{Al} (\text{Si}, \text{Cu}, \text{Mn}, \text{Fe}) + \text{S}]$ проводили при температуре $\sim 70^\circ \text{C}$ (около т. кип. SO_2Cl_2). Наибольший выход продуктов перхлорирования наблюдался при проведении реакции в течение 4 часов. Дальнейшее нагревание с данной хлорирующей смесью приводило к разложению ОХДД и ОХДФ, которое осуществляется с разрывом эфирных связей в диоксиновом или дибензофурановом фрагменте молекулы. Полное разложение ОХДД и ОХДФ наблюдается при проведении реакции перхлорирования в вышеуказанных условиях в течение 7 часов.

Подбор условий реакции осуществлялся на примере незамещенного дибензо-*p*-диоксида, дибензофурана, тетрахлорзамещенных дибензо-*p*-диоксинов и выделенных из реальных матриц (воздух, вода) очищенных экстрактов, содержащих ПХДД и ПХДФ. Выход продуктов перхлорирования в этих случаях достигал 70 % и стабиль-

но воспроизводился от опыта к опыту.

По отработанной методике мы провели эксперименты по перхлорированию экстрактов воды и экстрактов воздуха. В частности, перхлорированию подвергались экстракты газовых проб, полученных при горении пластмасс, и экстракты, полученные из реальной пробы воды по стандартной сертифицированной методике. При этом мы показали, что использование этого метода позволяет обнаруживать ПХДД/ПХДФ в виде ОХДД/ОХДФ на уровне не менее 1 нг в пробе.

Для сокращения времени хроматографического анализа образца мы применили укороченную колонку – 5 метров (см. экспериментальную часть – режим хроматографирования №2). Это позволило сократить время анализа с 40 до 15 минут при сохранении качественной картины хроматограммы. При этом ГЖХ-анализу подвергались экстракты реакционных смесей без предварительной очистки.

К недостаткам разработанной нами методики следует отнести то, что при анализе неочищенных реакционных смесей достаточно быстро выходит из строя хроматографическая колонка. Также нами было отмечено падение чувствительности детектора, что, по-видимому, происходит из-за химического воздействия на элементы колонки и детектора не до конца нейтрализованных компонентов применяемого реагента. Это делает необходимым введение дополнительной стадии очистки экстрактов реакционных смесей.

Выводы

1. В модельных экспериментах подобраны оптимальные условия проведения реакции перхлорирования с помощью реагента ВМС в модифицированных условиях на нанограммовых количествах ПХДД и ПХДФ.

2. Разработан модифицированный способ перхлорирования нативной ПХДД и ПХДФ, выделенной из реальных проб воды и воздуха.

3. Показано, что в реальных матрицах можно обнаруживать диоксины в виде их октахлорпроизводных (ОХДД и ОХДФ) на уровне менее 1 нг в пробе при помощи метода ГЖХ (с использованием укороченных колонок) с детектором электронного захвата.

4. На основании проведенных исследований и полученных результатов разработана методика обнаружения полихлорированных дибензо-*p*-диоксинов и полихлорированных дибензофуранов в пробах водных и воздушных сред методом ГЖХ с детектором электронного захвата.

ЛИТЕРАТУРА

1. Байерман К. Определение следовых количеств органических веществ. М.: Мир, 1987. 460 с.
2. Кунцевич А.Д. // Успехи химии. 1991. Т.60, №3. С.530-535.
3. Ключев Н.А. // ЖАХ. 1996. Т.5, № 2. С.163-172.
4. Biological mechanism of dioxin action / Ed. A. Poland, R.D. Kimbrough R.D. Intersc. 1984. P.500.
5. Dioxin risc. test. rapid detection kit user's Guide, ENSYS Immun. EPA/530-SW-87-025/.
6. Кунцевич А.Д., Кучинский Е.В., Поляков И.Т., Головкин В.Ф., Оружинин А.А., Сюткин В.Н. // ДАН. 1994. Т.335, № 3. С.326-329.
7. Hummpi T. // Chemosphere. 1986. V.15, № 9/12. P.2003-2006.
8. Chatkittikunwong W., Creaser C. S. // Chemosphere. 1994. V.28, №1. P.11-21.
9. Пат. 2070319 РФ. Способ определения в пробе групповой концентрации дибензо-п-диоксинов и групповой концентрации дибензофуранов/ А.А. Крашенинников, А.А.Строганов, О.В.Арапов, Е.В.Елисеенков. Оpubл. 10.12.96. Бюл. №34.
10. Operative control of dioxin xenobiotics (perchlorination reaction) / V.S.Soyfer, D.B.Feshin, N.A.Klyuev, E.Ya.Mir-Kadyrova, N.V. Mourenets // 17th International Symposium on Chlorinated Dioxins and Related compounds "Dioxin-98". Indianapolis. Indiana USA. 1997. V.31. P.1.
11. Gold V. Advances in Physical Organic Chemistry. Academic Press. 1963. P.233.
12. Brown H. C., Gintis D., Domash L.// J. Amer. Chem. Soc. 1956. V.78. P.5387.
13. Ballester M., Castaner J.// J. Amer. Chem. Soc. 1960. V.82. P.4259.
14. Newman M.A., North P.P., Boer F.P. // Acta Crystallogr. Sect. B. Struct. Crystallogr. 1972. V.28. P.2313.
15. Ballester M.// Bull. Soc.Chim. France. 1966. P.7-15.
16. Silberrad O. // J. Chem. Soc. 1921. V. 119. P. 2029-2036.
17. Silberrad O.//J.Chem. Soc. 1922. V.121. P.1015-1022.
18. Физер Л., Физер М. Реагенты для органического синтеза. М.: Наука, 1973.
19. Ballester M., Molinet C., Castaner J. // J. Amer. Chem. Soc. 1960. V.82. P.4254.
20. Ballester M., Rosa J. // Tetrahedron. 1960. V.9. P.156-162.
21. Ballester M. // AD 609569. Avail. CFSTI. 1964. P.33.
22. Ballester M. // U. S. Govt. Res. Develop. Rept. 1965. V.40, № 4. P.14.
23. Ballester M., Riera // J. Amer. Chem. Soc. 1964. V.86. P.4505.
24. Ballester M., Riera J., Castaner J., Carreras C., Ubiera J., Badia C., Miavitless C., Molins E. // J. Org. Chem. 1989. V.54, № 19. P.4611-4615.
25. Марч Дж. Органическая химия. М.: Мир, 1987.
26. Cum G., de la Mare P. B. D. // J. Chem. Soc. 1967. P.1590.
27. Yufit S.S. On the mechanism of formation of PCDD/PCDFs in thermal sources. The role of electronic factors // 19th International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs "Dioxin-99". 1999. Venice. Italy. V.41. P.315.

* * * * *